

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
13 mai 2004 (13.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/039810 A1(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07D 493/10, A61K 49/00, G01B 21/64(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003205(22) Date de dépôt international :  
28 octobre 2003 (28.10.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/13528 29 octobre 2002 (29.10.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LAB-  
ORATOIRES SYNTH-INNOVE [FR/FR]; 2bis, rue du  
Pont de l'Eure, F-75020 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
TRAN-GUYON, Joanne [FR/FR]; 5, rue Marcel Pagnol,  
F-78180 Montigny le Bretonneux (FR). SCHERNINSKI,  
François [FR/FR]; 5, rue des Goncourt, F-75011 Paris  
(FR).(74) Mandataires : TOUATI, Catherine etc.; Cabinet Plasser-  
aud, 65/67 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: HIGH PURITY PHTHALEIN DERIVATIVES AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : PHTHALEINES DE PURETE ELEVEE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns high purity phthalein derivatives enabling their use for medical applications or in the field of biotechnology, as well as their preparation method whereby a phthalic anhydride derivative is condensed with a naphthol or phenol derivative in an organic acid ester and the crystals of the resulting condensate are converted by action of a strong acid or one of its precursors in anhydrous medium.

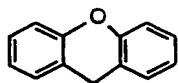
(57) Abrégé : La présente invention porte sur des phtaléines de pureté élevée qui leur permettent d'être utilisées pour des appli-  
cations médicales ou dans le domaine de la biotechnologie, ainsi que sur leur procédé de préparation suivant lequel un dérivé de  
l'anhydride phtalique est condensé avec un dérivé de naphthol ou de phénol dans un ester d'acide organique et les cristaux du produit  
de condensation obtenu sont convertis par action d'un acide fort ou un de ses précurseurs en milieu anhydre.

PHTALEINES DE PURETE ELEVEE ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION.

5 La présente invention porte sur des phtaléines de pureté élevée et sur leur procédé de préparation. Elle porte plus particulièrement sur la fluorescéine de pureté élevée.

Dans la présente description on entend par « phtaléine de pureté élevée » une phtaléine contenant au plus 1% en  
10 poids, de préférence au plus 0,5% en poids d'impuretés.

Les phtaléines sont des molécules présentant le motif xanthène suivant :



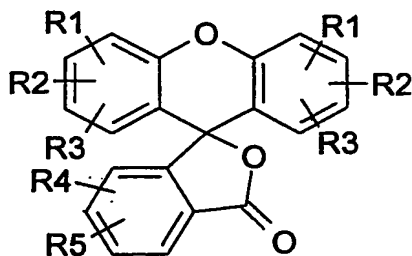
Ces produits sont utiles comme colorants dans diverses  
15 industries, notamment l'industrie textile, l'industrie du papier, l'imprimerie, la reprographie, l'industrie alimentaire, l'industrie cosmétique et l'industrie pharmaceutique. Les phtaléines font, actuellement, l'objet d'un important regain d'intérêt dans le domaine de la santé,  
20 pour leur utilisation diagnostique, notamment dans le cadre de l'imagerie médicale et dans le domaine des biotechnologies pour le marquage des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipoprotéines, lipides membranaires) et le suivi de l'activité biochimique intracellulaire ou  
25 extracellulaire des molécules biologiques.

Par exemple, la fluorescéine est une phtaléine couramment utilisée en ophtalmologie pour la réalisation d'angiographies en fluorescence de la rétine. L'intérêt diagnostique de l'angiographie fluorescéinique est  
30 actuellement accru par l'apparition de nouveaux médicaments

permettant le traitement des pathologies vasculaires de la  
rétine et de la choroïde et la disponibilité d'une nouvelle  
génération de rétinographes permettant la réalisation d'une  
imagerie numérisée en fluorescence plus performante et  
5 résolutive que les anciens systèmes d'acquisition sur  
émulsions photographiques.

Parallèlement les exigences de qualité et de sécurité  
des nouvelles normes pharmaceutiques internationales (ICH :  
International Commission of Harmonisation, ICH Q Topic Q3A  
10 1999) se sont considérablement accrues. Il en est de même en  
ce qui concerne les applications des phtaléines dans le  
domaine des biotechnologies qui nécessitent des réactifs de  
qualité de plus en plus élevée. Pour répondre aux exigences  
actuelles, le niveau de pureté des phtaléines utilisées dans  
15 le domaine pharmaceutique ou celui des biotechnologies doit  
nécessairement être très élevé. A titre d'exemple, dans la  
publication « Effective differences in the formulation of  
intravenous fluorescein and related side effects », Am. J.  
Ophthalmol. 78,2 : 217-221, 1974, L. Yannuzzi a montré qu'il  
20 existe une corrélation entre la pureté des phtaléines, en  
particulier celle de la fluorescéine, et la tolérance de ces  
substances lorsqu'elles sont administrées par voie injectable  
chez l'homme.

Les phtaléines de pureté élevée selon l'invention  
25 présentent la formule générale (I) :



(I)

dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5 qui sont identiques ou différents les uns des autres, sont choisis dans le groupe comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, hydroxyle, halogène, acétyle, amino, phosphate, nitro, sulfonate, carboxy, alkyl-carboxy de 2 à 30 atomes de carbone, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, carboxyalkyle ayant de 2 à 30 atomes de carbone, aminoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, sulfoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, aryl-alkyle, halogénoaryle, arylester, succinimidylester, isothiocyanate, maléimide, iodoacétamide, halogénoacétamide, chlorosulfonique, les bases puriques ou pyrimidiques, les oses, de préférence les hexoses ou les pentoses, les oligosides et les polyosides, les polypeptides, les protéines et les phospholipides, R1 et R5 ne représentant pas chacun l'hydrogène lorsque R1 représente un groupe  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , R2 représente un groupe hydroxy et R4 représente un groupe  $-\text{COOH}$ , ces phtaléines ne contenant pas plus de 1% en poids, de préférence pas plus de 0,5% en poids et plus préférentiellement encore pas plus de 0,2% en poids d'impuretés résiduelles.

Une phtaléine particulièrement intéressante, notamment pour des applications ophtalmiques est la fluorescéine présentant une telle pureté.

Il est connu de préparer les phtaléines de formule (I) par condensation d'un dérivé de l'anhydride phtalique et d'un

dérivé phénolique ayant une position libre en ortho d'un groupe hydroxyle.

Cette condensation est réalisée par chauffage à la température de fusion d'un mélange de l'anhydride phthalique et du dérivé phénolique, dans les proportions souhaitées.

Cette condensation peut éventuellement être réalisée dans un solvant de dilution. Elle peut également être conduite en présence d'un catalyseur.

En l'absence de solvant, lors du chauffage, le milieu réactionnel s'épaissit rapidement et a tendance à prendre en masse. Au sein du milieu réactionnel, il se forme alors des zones où la température est trop élevée et des zones où la température n'est pas assez élevée.

Dans les zones où la température est trop élevée, les réactifs et/ou le produit de réaction sont dégradés et dans les zones où la température n'est pas assez élevée, la réaction n'est pas complète. Le produit obtenu est de médiocre qualité car il comporte des sous-produits très difficiles à éliminer.

Afin d'améliorer ce procédé connu, on a proposé l'ajout d'un solvant inerte ou l'utilisation d'un catalyseur.

Aussi, le brevet US 1,931,049 décrit l'ajout au milieu réactionnel d'un solvant inerte constitué par un hydrocarbure benzénique ou aliphatique, plus particulièrement l'orthodichlorobenzène. Cependant, la réaction de condensation est alors incomplète, et il se forme des produits intermédiaires difficiles à éliminer par la suite. Il s'en suit que le procédé décrit dans le brevet US 1,931,049 ne permet pas l'obtention d'une phthaléine de pureté élevée selon la définition de la présente demande. Par ailleurs, les hydrocarbures aliphatiques supérieurs ne sont pas miscibles avec le milieu réactionnel; par conséquent, ils n'apportent pas d'amélioration sur le plan du transfert

thermique et gênent l'élimination de l'eau formée ce qui ralentit la réaction, laquelle a lieu exclusivement en milieu hydrophobe.

Pour ce qui est des catalyseurs proposés pour améliorer  
5 le rendement de la réaction, il s'agit de l'acide sulfurique concentré, du chlorure de zinc anhydre et du chlorure d'étain.

Dans le brevet allemand DE 360691, il a été proposé  
d'utiliser en tant que catalyseur, un acide sulfonique  
10 aromatique, tel que l'acide benzène sulfonique, seul ou associé à l'un des trois catalyseurs précités.

Il se trouve toutefois que l'adjonction de ces  
catalyseurs entraîne une prise en masse rapide du produit de  
la réaction avec un emprisonnement des impuretés qui ne  
15 peuvent plus être éliminées du produit recherché.

Afin d'éliminer les sous-produits formés et les  
impuretés, des procédés d'isolement et de purification ont  
été mis au point mais n'ont pas permis d'améliorer  
sensiblement la qualité des phtaléines.

20 Un procédé classiquement utilisé consiste à alcaliniser la phtaléine en milieu aqueux pour la dissoudre puis à l'acidifier pour permettre sa précipitation. Ces deux étapes sont renouvelées successivement pour tenter d'éliminer les impuretés. Néanmoins, cette méthode ne permet pas une  
25 amélioration notable de la pureté du produit car si les impuretés se dissolvent avec la phtaléine au cours de l'étape d'alcalinisation, elles précipitent à nouveau en même temps que la phtaléine au cours de l'étape d'acidification. De plus, cette méthode de purification a pour inconvénient de  
30 produire une quantité importante de sels qui sont difficiles et coûteux à éliminer par la suite.

Le brevet US 1,965,842 décrit la purification des phtaléines, dérivées de l'hydroxybenzène, par une extraction

directe des sous-produits à l'aide de dichlorobenzène utilisé seul ou en mélange avec d'autres solvants. Cette extraction directe du produit brut avec le solvant en question ne permet cependant pas une élimination poussée des impuretés qui  
5 restent en partie piégées dans les cristaux de phtaléine.

Aucun des procédés de purification décrits dans l'art antérieur ne permet d'atteindre un niveau de pureté suffisant pour permettre un usage pharmaceutique des phtaléines.

Etant donné l'intérêt de ces molécules pour le  
10 diagnostic médical, la fabrication de phtaléines de pureté élevée correspond à un réel besoin médical et répondrait à une forte demande, notamment pour des applications pharmaceutiques en ophtalmologie, pour le diagnostic notamment en imagerie médicale ou dans le domaine des  
15 applications en biotechnologie (par exemple pour le marquage de molécules).

Les inventeurs, à l'issue de recherches approfondies, ont eu le mérite de trouver qu'il était possible d'obtenir des produits de pureté élevée par condensation d'un anhydride  
20 phtalique avec un dérivé phénolique ou naphtholique dans un solvant particulier qui est constitué par un ester d'acide organique.

Ils ont également trouvé que l'utilisation des esters d'acide organique comme solvants permettait de réaliser cette  
25 condensation, avec un excellent rendement, supérieur à 75%.

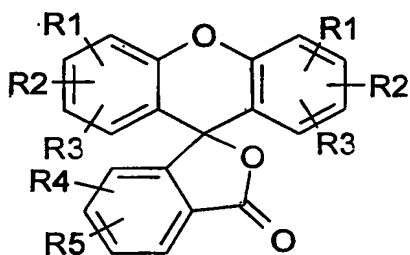
En effet, ces solvants ont la particularité

- d'une part, de conduire à une cristallisation spécifique de la phtaléine issue de la condensation et d'exclure, des cristaux formés, toutes les  
30 impuretés qui restent dissoutes dans le milieu réactionnel et
- d'autre part, de permettre que la réaction de condensation soit totale et prédomine au détriment

des réactions secondaires indésirables, ce qui conduit à la consommation totale des réactifs et minimise la formation des sous-produits.

Le procédé conforme à l'invention permet ainsi d'obtenir  
5 des phtaléines de pureté élevée avec un rendement satisfaisant sur le plan industriel.

Plus particulièrement, l'invention a donc pour objet un procédé de préparation de phtaléines, débarrassées de leurs impuretés résiduelles, présentant la formule générale (I) :



10

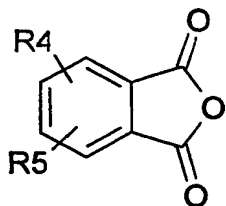
(I)

dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5 qui sont identiques ou différents les uns des autres, sont choisis dans le groupe  
15 comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, hydroxyle, halogène, acétyle, amino, phosphate, nitro, sulfonate, carboxy, alkyl-carboxy de 2 à 30 atomes de carbone, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, alkyloxy ayant  
20 de 1 à 30 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, carboxyalkyle ayant de 2 à 30 atomes de carbone, aminoalkyle ayant de 1 à  
25 30 atomes de carbone, sulfoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, aryl-alkyle, halogénoaryle, arylester, succinimidylester, isothiocyanate, maléimide,

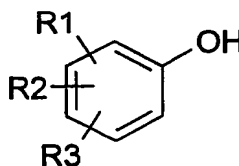


iodoacétamide, halogénoacétamide, chlorosulfonique, les bases puriques ou pyrimidiques, les oses, de préférence les hexoses ou les pentoses, les oligosides et les polysides, les polypeptides, les protéines et les phospholipides,

- 5 R1 et R5 ne représentant pas chacun l'hydrogène lorsque R1 représente un groupe  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , R2 représente un groupe hydroxy et R4 représente un groupe  $-\text{COOH}$ ,  
par condensation d'un dérivé de l'anhydride phtalique de formule (II) avec un composé phénolique ou naphtholique de  
10 formule (III)



(II)



(III)

- dans lesquelles R1, R2, R3, R4, R5 ont les mêmes  
15 significations que ci-dessus,  
au sein d'un solvant constitué par un ester d'acide organique.

- De façon particulièrement avantageuse, le composé de départ (III) qui est condensé avec l'anhydride phtalique (II)  
20 est choisi dans le groupe comprenant notamment le résorcinol, l'orcinol, le naphthol, le pyrogallol, l'alkylaminophénol et l'arylamino-phénol.

- Dans le cas où le résorcinol est utilisé comme produit de départ, le procédé conforme à l'invention permet la  
25 préparation de la fluorescéine.

De façon avantageuse, le solvant utilisé dans le procédé

conforme à l'invention est un ester d'acide organique de formule (IV)



5 dans laquelle  $R_6$  est choisi dans le groupe comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, nitroalkyle  
10 ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, alkyl-aryle, aryl-alkyle, aryl-alkyle substitué, halogénoaryle, arylester, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone,  $R_7$  représentant un groupe alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone,  
15 cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, alkyl-aryl, aryl-alkyle, aryl-alkyle substitué, halogénoaryle, arylester, alkylester ayant de 2 à  
20 40 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone.

De façon particulièrement avantageuse, le susdit solvant est choisi dans le groupe comprenant les benzoates, les heptanoates, les octanoates, les laurates, les myristates et  
25 les palmitates de méthyle, d'éthyle, de propyle ou de butyle, et leurs mélanges.

Le solvant est choisi en fonction de sa température d'ébullition, de façon à permettre de conduire la réaction de condensation à une température comprise entre 150°C et 250°C.

30 La réaction de condensation peut être conduite à la pression atmosphérique ou sous une pression adaptée en fonction de la différence existant entre la température correspondant au point d'ébullition du solvant utilisé et la

température nécessaire pour conduire la réaction, en particulier sous une pression supérieure à la pression atmosphérique lorsque le point d'ébullition du composé (IV) est plus bas que la température de la réaction.

5        La réaction de condensation peut être conduite en présence d'un catalyseur choisi dans le groupe comprenant notamment les acides de Lewis, tels que  $\text{ZnCl}_2$  ou  $\text{AlCl}_3$ , les acides de Brönsted tels que  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , l'acide polyphosphorique ou leurs sels.

10        De façon avantageuse, le catalyseur utilisé est un sel alcalin d'hydrogénosulfate. De façon particulièrement avantageuse, le catalyseur utilisé est l'hydrogénosulfate de potassium ( $\text{KHSO}_4$ ) ou l'hydrogénosulfate de sodium. L'utilisation d'hydrogénosulfate comme catalyseur permet  
15 l'obtention d'un excellent rendement pour la réaction de condensation et présente l'avantage, contrairement aux autres catalyseurs, de permettre l'obtention d'une condensation complète des réactifs, de pouvoir être éliminé totalement de la phtaléine obtenue et de ne pas induire la formation de  
20 goudrons dans le milieu réactionnel.

A l'issue de la réaction de condensation, on obtient un produit brut dont la pureté organique est déjà beaucoup plus élevée que celle des produits issus des procédés de l'art antérieur puisqu'elle est égale ou supérieure à 95%.

25        Néanmoins cette pureté n'est pas encore suffisante pour permettre une utilisation pharmaceutique notamment par voie injectable. D'autre part, comme montré ci-dessus, les méthodes de purification décrites dans l'art antérieur ne conduisent pas à un procédé permettant d'améliorer  
30 notablement cette pureté.

A l'issue de recherches approfondies et de façon tout à fait inattendue, les inventeurs ont trouvé qu'il était possible d'augmenter considérablement la pureté des

phtaléines brutes obtenues par la réaction de condensation en les traitant par un acide fort ou un de ses précurseurs dans un milieu organique anhydre.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé conforme à l'invention comporte, par conséquent, après la réaction de condensation, une étape consistant à acidifier le produit résultant de la condensation, en milieu organique anhydre, par addition d'un acide fort ou un de ses précurseurs choisi dans le groupe comprenant notamment l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide fluorhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide polyphosphorique, le pyrophosphate ( $P_2O_5$ ), et leurs mélanges. Cette acidification est conduite jusqu'à la conversion des cristaux de phtaléine résultant de la condensation, en cristaux de phtaléine de structure différente.

Cette étape d'acidification a pour effet de convertir la phtaléine brute insoluble et dispersée dans le milieu organique en une forme de structure cristalline différente et peu soluble dans ce même milieu. Cette conversion est très rapide, et s'effectue en passant par une phase de solubilisation intermédiaire au cours de laquelle les impuretés sont libérées et éliminées totalement des cristaux de phtaléine. Ce nouveau procédé de purification est très avantageux car il nécessite très peu de solvant et permet l'obtention d'une pureté très élevée en un temps très bref.

Selon le procédé de la présente invention, cette étape de purification est réalisée en dispersant la phtaléine brute issue de la condensation, dans un solvant anhydre, de préférence dans un alcool, une cétone, un éther, un solvant halogéné, utilisé seul ou en mélange, plus préférentiellement encore dans l'éthanol absolu ou l'acétone seul ou en mélange.

La dispersion de phtaléine brute ainsi obtenue est acidifiée par addition d'un acide fort ou un de ses précurseurs choisi dans le groupe comprenant notamment l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide fluorhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide polyphosphorique, le pyrophosphate ( $P_2O_5$ ) et leurs mélanges.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'acidification est réalisée soit en faisant barboter de l'acide chlorhydrique gazeux dans la dispersion de phtaléine, soit en ajoutant de l'acide chlorhydrique préalablement dissous dans un solvant organique.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé conforme à l'invention, le produit obtenu après acidification est lavé à l'aide d'une solution de lavage choisie dans le groupe comprenant l'eau, les solvants polaires comme les alcools, les cétones, ou les solvants légèrement polaires comme les éthers et les solvants halogénés, utilisés purs ou en mélange.

A l'issue de l'étape de purification, les phtaléines ainsi traitées ont une pureté supérieure à 98%, de préférence supérieure à 99 %, plus préférentiellement supérieure à 99,5%, et encore plus préférentiellement de 99,8%.

Les phtaléines ainsi obtenues ont une qualité adaptée pour permettre la préparation d'une autre phtaléine de formule (I) par modification chimique des groupements R1, R2, R3, R4, R5 selon les procédés classiques de l'art, notamment pour l'obtention de phtaléines utilisables pour le marquage des molécules biologiques (acides nucléiques, protéines, lipoprotéines, lipides membranaires) et dans le domaine des applications en biotechnologie (par exemple pour le marquage de molécules et de leur activité biochimique intra ou extracellulaire).

L'invention est particulièrement adaptée pour la préparation de fluorescéine de très grande pureté, c'est à dire telle que sa teneur en chacun des sous-produits de la réaction est inférieure ou égale à 0,2% et de préférence 5 inférieure ou égale à 0,1%, la somme des teneurs en chacun de ces sous-produits étant inférieure ou égale à 0,5%.

Le procédé de préparation d'une fluorescéine présentant la susdite pureté comprend les étapes successives suivantes :

- condensation de l'anhydride phtalique avec le résorcinol, dans un solvant qui est un ester d'acide organique aliphatique ou aromatique, de préférence le benzoate de méthyle, en présence d'un catalyseur choisi dans le groupe des acides de Brönsted,
- 10 - mise en suspension des cristaux de couleur rouge obtenus à l'étape précédente dans un solvant anhydre choisi dans le groupe comprenant les alcools tels que l'éthanol absolu, les cétones telles que l'acétone, les éthers, les solvants halogénés, ou leurs mélanges,
- 15 - acidification de la suspension obtenue par addition d'un acide fort ou un de ses précurseurs choisi dans le groupe comprenant l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide fluorhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide polyphosphorique, le pyrophosphate ( $P_2O_5$ ), ou leurs mélanges, jusqu'à l'obtention de cristaux de couleur jaune,
- 20 - lavage des cristaux ainsi obtenus à l'aide d'une solution de lavage choisie dans le groupe comprenant l'eau, les alcools, les cétones, les éthers et les solvants halogénés, purs ou en mélange, jusqu'à l'obtention de cristaux de couleur rouge.
- 25
- 30

Les cristaux de fluorescéine de couleur rouge présentent un cristallographe RX tel que celui représenté sur la figure 1; les cristaux de fluorescéine de couleur jaune présentent

un cristallographe RX tel que celui représenté sur la figure 2; ces cristallographes étant réalisés sur l'appareillage suivant: Générateur PHILIPS 1729, Goniomètre PHILIPS 1050, Radiation Cu K $\alpha$ , Logiciel acquisition GONIO et Logiciel traitement RAYON, dans les conditions opératoires suivantes:

Tension	: 40 mV
Intensité	: 40 mA
Nombre de points	: 4000
Nombre de passages	: 10
Période d'acquisition	: 250 ms
Angle de départ ( $^{\circ}\theta$ )	: 3.000
Angle de fin ( $^{\circ}\theta$ )	: 23.000
Etalon	: Silicium

10

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation de la fluorescéine, le catalyseur utilisé pour la réaction de condensation est de l'hydrogénosulfate d'un métal alcalin, de préférence de l'hydrogénosulfate de potassium ou de sodium.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du procédé de préparation de la fluorescéine, l'acidification est réalisée par barbotage d'acide chlorhydrique gazeux dans la suspension de fluorescéine ou par l'action, sur cette fluorescéine, d'acide chlorhydrique en solution dans un solvant organique anhydre, choisi de préférence dans le groupe comprenant les alcools, les cétones, les éthers et les solvants halogénés utilisés isolément ou en mélange, plus préférentiellement encore, l'isopropanol, l'éthanol absolu ou l'acétone, purs ou en mélange.

De façon avantageuse, l'étape de lavage est réalisée à l'aide d'un mélange d'eau, d'éthanol et d'acétone.

Grâce à ce procédé conforme à l'invention possible de préparer de la fluorescéine présentant égale ou supérieure à 99,7%, ce qui présente des incontestables...notamment pour les ut  
5 pharmaceutiques en diagnostic notamment en imagerie ou encore dans le domaine des applications en biote

Les inventeurs ont mis en évidence une nouv  
cristallographique de la fluorescéine présentant de  
de couleur jaune. Cette nouvelle forme crista  
10 identifiée par le spectre de radiocristallograp  
Figure 2 qui a été réalisé dans les conditions m  
ci-dessus.

Ils ont également mis en évidence une nouv  
cristallographique des composés suivants  
15 dihydroxyfluorescéine et 4',5'-diméthylfluorescéine

Ainsi, l'invention porte sur les cri  
fluorescéine de...couleur...jaune dont...le...s  
radiocristallographie est donné sur la Figure 2.

L'invention porte également sur les cristaux  
20 dihydroxyfluorescéine de couleur jaune dont le  
radiocristallographie est donné sur la Figure 4.

Elle porte également sur les cristaux  
diméthylfluorescéine de couleur rouge sombre dont  
de radiocristallographie est donné sur la Figure 6

25 Tous les spectres ont été réalisés avec l'ac



**EXEMPLES****EXEMPLE 1: Préparation de fluorescéine de pureté élevée****Synthèse de la fluorescéine :**

5 Un mélange comprenant 55 g de résorcinol, 30 g d'anhydride phtalique, 2 g d'hydrogénosulfate de potassium et 500 ml de benzoate de méthyle est porté à 200°C pendant 6 heures. Après refroidissement, les cristaux rouges de fluorescéine brute sont lavés à l'acétone et séchés.

10 Masse obtenue = 51,8 g (78%).

Ces cristaux sont analysés par radiocristallographie dans les conditions opératoires suivantes:

**Appareil**

Générateur PHILIPS 1729  
15 Goniomètre PHILIPS 1050  
Radiation Cu K $\alpha$   
Logiciel acquisition GONIO  
Logiciel traitement RAYON

**Conditions**

Tension : 40 mV  
Intensité : 40 mA  
Nombre de points : 4000  
Nombre de passages : 10  
Période d'acquisition : 250 ms  
Angle de départ ( $^{\circ}\theta$ ) : 3.000  
Angle de fin ( $^{\circ}\theta$ ) : 23.000  
Etalon : Silicium

On obtient le radiocristallographe de la figure 1, dont les pics sont identifiés ci-après.

	Théta (degrés)	Distance (Å)	% intensités	Nombre de coups
25	5.3600	8.2457	18.09	647
	5.9500	7.4306	31.10	1112
	6.7000	6.6020	36.30	1298
	8.3750	5.2883	45.95	1643
30	9.1050	4.8675	10.79	386
	9.4300	4.7012	14.09	504
	9.9950	4.4379	8.03	287
	10.9150	4.0678	9.73	348
	11.6200	3.8241	16,41	587
35	11.7300	3.7888	5.40	193

	12.4200	3.5813	2.82	101
	13.2150	3.3694	100.00	3576
	13.5050	3.2983	7.47	267
	13.8850	3.2097	79.03	2826
5	14.9650	2.9828	5.62	201
	15.3100	2.9172	3.91	140
	15.7600	2.8359	11.69	418
	16.0000	2.7945	8.67	310
	16.9100	2.6481	4.28	153
10	17.4750	2.5650	3.97	142
	17.8550	2.5122	3.80	136
	18.2300	2.4622	2.52	90
	18.5150	2.4256	2.96	106
	18.8250	2.3871	5.03	180
15	19.0800	2.3563	3.27	117
	20.4300	2.2066	3.05	109
	20.6800	2.1811	4.53	162
	20.9300	2.1562	3.08	110
	21.1800	2.1319	2.38	85
20	22.9400	1.9762	4.53	162

longueur d'onde: 1.54051 Å

#### Purification de la fluorescéine brute :

50 g de fluorescéine brute obtenus à l'étape précédente  
25 sont agités dans 1000 ml de mélange éthanol/acétone. A ce  
mélange est ajouté de l'acide sulfurique concentré jusqu'à  
conversion complète des cristaux rouges en cristaux jaunes.

Les cristaux jaunes obtenus sont analysés par  
radiocristallographie comme précédemment. On obtient le  
30 radiocristallographe de la figure 2, dont les pics sont  
identifiés ci-après.

Thêta (degrés)	Distances (Å)	% Intensités	Nbre de coups
3.3500	13.1813	8.55	56
4.0050	11.0283	47.18	309
4.8550	9.1010	12.98	85
5.2650	8.3940	9.01	59
5.4500	8.1099	11.45	75
5.7900	7.6352	52.98	347
6.3000	7.0193	16.95	111
6.7700	6.5340	17.86	117
7.4900	5.9090	17.56	115
8.0300	5.5140	69.77	457
8.4250	5.2572	33.13	217
8.7800	5.0462	8.40	55
9.1550	4.8411	15.88	104

9.3400	4.7461	42.44	278
9.6550	4.5926	34.66	227
9.8800	4.4891	24.43	160
10.1950	4.3518	57.71	378
10.5800	4.1951	58.02	380
10.7350	4.1352	38.17	250
11.1650	3.9779	28.85	189
11.4800	3.8701	30.23	198
11.7200	3.7919	59.85	392
12.1100	3.6716	26.41	173
12.3950	3.5884	58.47	383
12.6400	3.5200	100.00	655
12.9450	3.4384	30.84	202
13.1550	3.3845	56.64	371
13.8350	3.2211	14.66	96
14.0550	3.1717	24.12	158
14.3550	3.1068	36.34	238
14.6700	3.0415	42.90	281
15.1300	2.9511	42.90	281
15.7500	2.8377	18.47	121
15.9400	2.8047	18.17	119
16.2500	2.7526	15.42	101
16.7550	2.6719	17.71	116
16.8500	2.6573	19.39	127
17.2250	2.6011	18.17	119
17.7300	2.5293	15.73	103
18.4200	2.4377	10.23	67
18.5750	2.4180	10.23	67
19.2650	2.3345	15.88	104
19.5800	2.2984	10.84	71
19.8000	2.2739	11.91	78
20.1150	2.2397	13.28	87
20.6500	2.1841	14.81	97
21.1500	2.1348	11.30	74
21.2750	2.1228	10.08	66
21.8100	2.0732	7.94	52
22.2500	2.0342	9.16	60
22.6250	2.0022	9.62	63
22.9100	1.9786	9.01	59

Longueur d'onde : 1.54051 Å

Ces cristaux sont filtrés puis lavés avec un mélange éthanol/acétone/eau (40/40/20). Le lavage reconvertit les  
5 cristaux de fluorescéine jaune en cristaux de fluorescéine rouge dont la pureté est plus élevée.

Pureté en CLHP : 99,8%

**EXEMPLE 2: Préparation de la 4',5'-diméthylfluorescéine de pureté élevée.**

**Synthèse de la 4',5'-diméthylfluorescéine**

5

Un mélange comprenant 62 g de 2-méthylrésorcinol, 30 g d'anhydride phtalique, 2g d'hydrogénosulfate de potassium et 500 ml de laurate d'éthyle est porté à 200°C pendant 3 heures. Après refroidissement, le produit brut est filtré et  
10 lavé à l'acétone puis séché. Le produit obtenu est une poudre orange foncé.

Masse obtenue = 49,7 g (69%)

Ces cristaux sont analysés par radiocristallographie de la même façon que dans l'exemple 1. On obtient le  
15 radiocristallographe de la figure 3, dont les pics sont identifiés ci-après.

Thêta (degrés)	Distances Å	% Intensités	Nbre de coups
3,5700	12.3700	7.38	81
5.0290	8.7938	45.49	499
6.6650	6.6365	62.26	683
6.7400	6.5630	60.07	659
7.1300	6.2057	87.24	957
7.4550	5.9366	20.97	230
8.3700	5.2915	6.56	72
8.9300	4.9621	30.63	336
9.0950	4.8728	10.12	111
9.3300	4.7511	21.24	233
9.4550	4.6889	19.05	209
10.0350	4.4204	12.12	133
10.3250	4.2975	18.87	207
10.6000	4.1873	11.49	126
10.8300	4.0994	39.65	435
11.2900	3.9344	12.49	137
11.4500	3.8801	10.85	119
11.7550	3.7808	28.17	309
11.9050	3.7339	52.42	575
12.2550	3.6288	79.95	877
12.7050	3.5023	8.11	89
13.2400	3.3631	21.15	232
13.4200	3.3188	100.00	1097
13.7100	3.2499	10.85	119
14.5250	3.0712	8.84	97

14.8350	3.0084	23.25	255
15.0550	2.9654	17.59	193
15.1550	2.9463	15.13	166
15.3650	2.9070	25.80	283
15.7050	2.8456	20.51	225
16.1900	2.7625	14.13	155
16.7550	2.6719	9.02	99
17.5400	2.5558	7.47	82
17.8850	2.5081	8.75	96
18.1050	2.4786	6.75	74
18.4900	2.4288	19.51	214
18.7950	2.3907	6.11	67
18.8900	2.3791	6.84	75
19.6800	2.2872	15.50	170
20.2100	2.2296	7.38	81
20.3950	2.2103	9.66	106
20.6800	2.1811	6.84	75
20.9950	2.1498	5.38	59
21.4650	2.1049	7.11	78
21.6500	2.0878	8.84	97
21.9350	2.0620	9.21	101
22.1250	2.0451	9.02	99
22.5300	2.0102	5.47	60
22.7850	1.9889	5.93	65

Longueur d'onde : 1.54051 Å

#### Purification de la 4',5'-diméthylfluorescéine

40 g de 4',5' -diméthylfluorescéine brute sont ajoutés dans 800 ml de mélange éthanol/acétone. A ce mélange est  
5 ajouté de l'acide sulfurique concentré jusqu'à conversion complète de cristaux de couleur orange foncé en cristaux de couleur jaune.

Les cristaux jaunes obtenus sont analysés par radiocristallographie comme précédemment. On obtient le  
10 radiocristallographe de la figure 4, dont les pics sont identifiés ci-après.

Thêta (degrés)	Distances (Å)	% Intensités	Nbre de coups
3.7050	11.9199	22.22	172
4.6150	9.5732	45.61	353
4.9300	8.9629	46.77	362
6.3300	6.9861	8.53	66
6.6150	6.6864	6.20	48
7.3000	6.0619	19.51	151
7.4500	5.9405	32.56	252

7.6500	5.7861	26.61	206
8.1250	5.4499	64.21	497
8.6300	5.1332	22.48	174
9.5950	4.6211	6.59	51
10.4450	4.2487	41.34	320
10.8500	4.0919	10.21	79
11.3550	3.9122	14.60	113
11.7000	3.7983	9.17	71
11.7950	3.7682	9.30	72
12.2250	3.6375	23.13	179
12.4500	3.5728	58.79	455
12.7650	3.4861	19.90	154
12.8950	3.4515	18.60	144
13.1000	3.3984	100.00	774
13.6350	3.2675	67.44	522
14.1400	3.1530	30.75	238
14.5250	3.0712	14.08	109
14.8400	3.0074	22.74	176
15.1750	2.9425	19.38	150
15.3500	2.9098	30.23	234
15.6950	2.8474	20.92	162
16.0950	2.7784	7.24	56
16.2850	2.7468	7.49	58
16.5950	2.6969	8.01	62
16.9100	2.6481	14.08	109
17.3200	2.5873	8.66	67
17.5400	2.5558	7.88	61
17.9150	2.5040	13.31	103
18.3550	2.4460	9.69	75
18.4800	2.4300	10.59	82
18.8600	2.3828	15.37	119
19.2350	2.3380	9.43	73
19.4850	2.3092	7.75	60
20.2100	2.2296	14.99	116
20.7100	2.1781	7.11	55
20.8350	2.1656	6.59	51
21.0850	2.1411	6.33	49
21.5250	2.0993	12.92	100
21.6500	2.0878	8.79	68
21.8400	2.0705	6.98	54
22.0900	2.0482	10.34	80
226550	1.9997	7.11	55

Longueur d'onde : 1.54051 Å

Après filtration et recristallisation dans un mélange acétone/eau ou lavage dans éthanol/acétone/eau, les cristaux  
5 de couleur jaune se reconvertissent en cristaux de couleur orange foncé.

**EXEMPLE 3: Préparation de la 4',5'-dihydroxyfluorescéine****Synthèse de la 4',5'-dihydroxyfluorescéine**

5

Un mélange comprenant 63 g de pyrogallol, 30 g d'anhydride phtalique, 2g d'hydrogénosulfate de potassium et 500 ml de myristate d'éthyle est porté à 200°C pendant 3 heures. Après refroidissement, le produit brut est filtré et  
 10 lavé à l'acétone puis séché. Le produit obtenu est une poudre marron-gris ou anthracite.

Masse obtenue = 43,5 g (59,7%)

Les cristaux obtenus sont analysés par radiocristallographie comme précédemment. On obtient le  
 15 radiocristallographe de la figure 5, dont les pics sont identifiés ci-après.

Thêta (degrés)	Distances (Å)	% Intensités	Nbre de coups
3.6450	12.1158	73.08	980
5.9200	7.4681	8.13	109
6.7200	6.5824	13.35	179
7.3350	6.0331	10.29	138
8.5050	5.2081	11.78	158
9.2300	4.8021	15.59	209
9.7400	4.5529	18.20	244
10.3400	4.2914	21.40	287
10.9150	4.0678	6.71	90
11.2600	3.9447	8.80	118
12.2550	3.6288	18.64	250
12.5550	3.5434	12.75	171
13.2000	3.3731	11.86	159
13.7200	3.2476	100.00	1341
14.7150	3.0324	17,75	238
14.8600	3.0034	13.57	182
16.1600	2.7675	6.79	91
17.2550	2.5967	7.83	105
18.3550	2.4460	6.86	92

Longueur d'onde : 1.54051 Å

### Purification de la 4',5'-dihydroxyfluorescéine

40 g de 4',5'-dihydroxyfluorescéine brute sont ajoutés dans 800 ml de mélange éthanol/acétone. A ce mélange est ajouté de l'acide sulfurique concentré jusqu'à conversion  
5 complète de cristaux de couleur marron-gris ou anthracite en cristaux de couleur marron-rouge ou acajou.

Les cristaux obtenus sont analysés par radiocristallographie comme précédemment. On obtient le radiocristallographe de la figure 6, dont les pics sont  
10 identifiés ci-après.

Thêta (degrés)	Distances (Å)	% Intensités	Nbre de coups
3.2500	13.5865	90.53	526
3.5350	12.4923	18.76	109
3.7850	11.6683	11.70	68
3.9450	11.1958	13.25	77
4.1650	10.6053	15.15	88
4.5400	9.7310	10.33	60
4.6350	9.5319	10.15	59
6.3950	6.9154	9.29	54
6.5500	6.7525	11.53	67
6.8200	6.4863	27.71	161
7.1150	6.2187	10.50	61
7.4800	5.9168	21.51	125
7.8700	5.6253	12.91	75
8.2200	5.3874	27.88	162
8.7800	5.0462	41.48	241
9.2200	4.8073	10.15	59
9.5350	4.6499	11.70	68
9.7950	4.5276	42.17	245
10.1000	4.3923	17.21	100
10.5400	4.2108	16.70	97
10.8850	4.0789	16.52	96
11.6500	3.8144	25.13	146
11.8900	3.7385	13.60	79
12.0450	3.6911	13.08	76
12.3900	3.5898	16.52	96
12.5800	3.5365	14.80	86
12.8750	3.4568	27.37	159
12.9950	3.4254	25.82	150
13.2900	3.3507	67.64	393
13.5750	3.2816	27.02	157
13.7150	3.2488	27.02	157
14.1100	3.1596	100.00	581
14.6200	3.0516	15.66	91
14.7750	3.0203	18.24	106
15.0400	2.9683	25.13	146



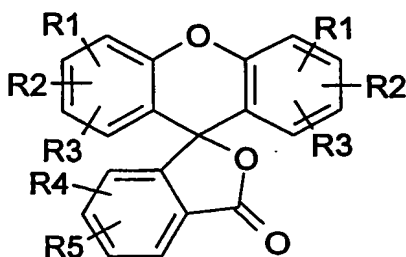
15.3050	2.9181	24.78	144
15.6850	2.8491	16.35	95
15.9400	2.8047	11.02	64
16.2500	2.7526	10.67	62
16.5950	2.6969	12.22	71
17.1650	2.6099	9.81	57
17.5700	2.5516	8.78	51
17.7600	2.5252	9.81	57
18.0750	2.4826	11.36	66
18.5150	2.4256	8.43	49
18.7650	2.3944	13.08	76
19.0450	2.3605	11.36	66
20.1950	2.2312	50,09	291
20.6150	2.1877	9.12	53
21.0550	2.1440	12.56	73
21.4650	2.1049	9.29	54
21.6850	2.0846	9.98	58
22.0600	2.0509	9.81	57

Longueur d'onde : 1.54051 Å

Après filtration et lavage dans l'eau, les cristaux de couleur marron-rouge ou acajou se reconvertissent en cristaux  
5 de couleur marron-gris ou anthracite.

REVENDICATIONS

1. Phtaléine de formule générale (I) :



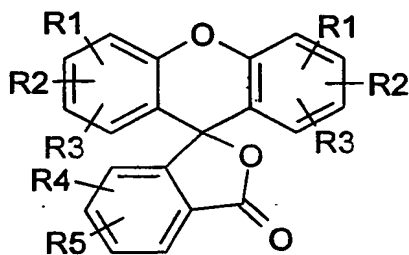
(I)

dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5 qui sont identiques ou différents les uns des autres, sont choisis dans le groupe comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, hydroxyle, halogène, acétyle, amino, phosphate, nitro, sulfonate, carboxy, alkyl-carboxy de 2 à 30 atomes de carbone, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, carboxyalkyle ayant de 2 à 30 atomes de carbone, aminoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, sulfoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, aryl-alkyle, halogénoaryle, arylester, succinimidylester, isothiocyanate, maléimide, iodoacétamide, halogénoacétamide, chlorosulfonique, les bases puriques ou pyrimidiques, les oses, de préférence les hexoses ou les pentoses, les oligosides et les polysides, les polypeptides, les protéines et les phospholipides, R1 et R5 ne représentant pas chacun l'hydrogène lorsque R1 représente un groupe  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , R2 représente un groupe hydroxy et R4 représente un groupe  $-\text{COOH}$ ,

ces phtaléines ne contenant pas plus de 1% en poids, de préférence pas plus de 0,5% en poids et plus préférentiellement encore pas plus de 0,2% en poids d'impuretés résiduelles.

5 2. Phtaléine selon la revendication 1 constituée par la fluorescéine.

3. Procédé de préparation des phtaléines, débarassées de leurs impuretés résiduelles, présentant la formule générale (I) :



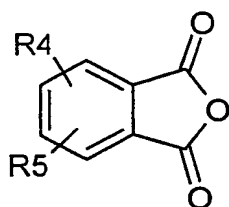
(I)

dans laquelle R1, R2, R3, R4, R5 qui sont identiques ou différents les uns des autres, sont choisis dans le groupe  
 15 comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, hydroxyle, halogène, acétyle, amino, phosphate, nitro, sulfonate, carboxy, alkyl-carboxy de 2 à 30 atomes de carbone, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, alkyloxy ayant  
 20 de 1 à 30 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, carboxyalkyle ayant de 2 à 30 atomes de carbone, aminoalkyle ayant de 1 à  
 25 30 atomes de carbone, sulfoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, aryl-alkyle, halogénoaryle, arylester, succinimidylester, isothiocyanate, maléimide,

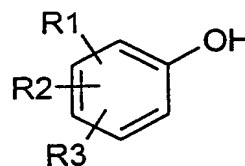
iodoacétamide, halogénoacétamide, chlorosulfonique, les bases puriques ou pyrimidiques, les oses, de préférence les hexoses ou les pentoses, les oligosides et les polysides, les polypeptides, les protéines et les phospholipides,

5 R1 et R5 ne représentant pas chacun l'hydrogène lorsque R1 représente un groupe  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , R2 représente un groupe hydroxy et R4 représente un groupe  $-\text{COOH}$ , caractérisé par le fait que l'on condense un dérivé de l'anhydride phtalique de formule (II) avec un composé

10 phénolique ou naphtholique de formule (III)



(II)



(III)

dans lesquelles R1, R2, R3, R4, R5 ont les mêmes significations que ci-dessus,

15 la condensation étant effectuée dans un solvant constitué par un ester d'acide organique.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le composé de formule (III) est choisi dans le groupe comprenant le résorcinol, l'orcinol, le naphthol, le pyrogallol,

20 l'alkylaminophénol et l'arylamino-phénol.

5. Procédé selon l'une des revendications 3 et 4, dans lequel le solvant est un ester d'acide organique de formule (IV)

25



dans laquelle  $R_6$  est choisi dans le groupe comprenant les radicaux ou groupements suivants : hydrogène, alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, alkyl-aryle, aryl-alkyle, aryl-alkyle substitué, halogénoaryle, ary-lester, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone,  $R_7$  représentant un groupe alkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, cycloalkyle ayant de 3 à 12 atomes de carbone, halogénoalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, hydroxyalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, nitroalkyle ayant de 1 à 30 atomes de carbone, aryle, aryloxy, alkyl-aryle, aryl-alkyle, aryl-alkyle substitué, halogénoaryle, ary-lester, alkylester ayant de 2 à 40 atomes de carbone, alkyloxy ayant de 1 à 30 atomes de carbone.

6. Procédé selon l'une des revendications 3 à 5, caractérisé par le fait que l'ester d'acide organique est choisi dans le groupe comprenant le benzoate, l'heptanoate, l'octanoate, le laurate, le myristate ou le palmitate de méthyle, d'éthyle, de propyle ou de butyle, et leurs mélanges.

7. Procédé selon l'une des revendications 3 à 6, caractérisé par le fait que la réaction de condensation est conduite entre 150°C et 250°C, éventuellement sous pression.

8. Procédé selon l'une des revendications 3 à 7, caractérisé par le fait qu'il est conduit en présence d'un catalyseur choisi dans le groupe comprenant notamment les acides de Lewis, tels que  $ZnCl_2$  ou  $AlCl_3$ , les acides de Bronsted tels que  $H_2SO_4$  ou l'acide polyphosphorique, de préférence un hydrogénosulfate alcalin et plus

préférentiellement l'hydrogénosulfate de potassium ( $\text{KHSO}_4$ ) ou l'hydrogénosulfate de sodium ( $\text{NaHSO}_4$ ).

9. Procédé selon l'une des revendications 3 à 8, caractérisé par le fait qu'il comprend une étape consistant à  
5 acidifier le produit résultant de la condensation, en milieu organique anhydre, par addition d'un acide fort ou un de ses précurseurs choisi dans le groupe comprenant l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide fluorhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide  
10 polyphosphorique, le pyrophosphate ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) et leurs mélanges, l'acidification étant menée jusqu'à conversion des cristaux de phtaléine résultant de la condensation en cristaux de phtaléine de structure différente.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé par  
15 le fait qu'il comporte une étape de lavage du produit obtenu après acidification, ladite étape de lavage étant effectuée à l'aide d'une solution de lavage choisie dans le groupe comprenant l'eau, les alcools, les cétones, les éthers et les solvants halogénés, purs ou en mélange.

20 11. Procédé de préparation d'une fluorescéine présentant une pureté telle que sa teneur en chacun des sous-produits de la réaction est inférieure ou égale à 0,2% et de préférence inférieure ou égale à 0,1%, la somme des teneurs en chacun de ces sous-produits étant inférieure ou égale à  
25 0,5%, ledit procédé comprenant les étapes successives suivantes :

- condensation de l'anhydride phtalique avec le résorcinol, dans un solvant constitué par un ester d'acide organique aliphatique ou aromatique, de préférence le benzoate ou le  
30 palmitate d'éthyle ou de méthyle, en présence d'un catalyseur choisi dans le groupe comprenant notamment les acides de Lewis ou les acides de Bronsted, et de préférence un hydrogénosulfate alcalin,

- mise en suspension des cristaux de couleur rouge obtenus à l'étape précédente dans un solvant anhydre choisi dans le groupe comprenant les alcools tel que l'éthanol absolu, les cétones telles que l'acétone, les éthers, les solvants halogénés, ou leurs mélanges,
- acidification de la suspension ainsi obtenue par addition d'un acide fort ou un de ses précurseurs choisi dans le groupe comprenant notamment l'acide sulfurique, l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide fluorhydrique, l'acide iodhydrique, l'acide polyphosphorique, le pyrophosphate ( $P_2O_5$ ), et leurs mélanges, jusqu'à conversion des cristaux de couleur rouge en cristaux de couleur jaune présentant le spectre de radiocristallographie de la figure 2,
- lavage des cristaux obtenus à l'aide d'une solution de lavage choisie dans le groupe comprenant l'eau, les alcools, les cétones, les éthers et les solvants halogénés, purs ou en mélange; ce lavage étant poursuivi jusqu'à la reconversion des cristaux de couleur jaune en cristaux de rouge.

12. Procédé selon l'une des revendications 9 à 11, caractérisé par le fait que l'acidification est réalisée par barbotage d'acide chlorhydrique gazeux dans la suspension de phtaléine ou par l'action sur cette phtaléine d'acide chlorhydrique en solution dans le solvant organique anhydre, de préférence un alcool, une cétone, un éther, un solvant halogéné utilisés isolément ou en mélange, plus préférentiellement encore, l'isopropanol, l'éthanol absolu ou l'acétone, purs ou en mélange.

13. Procédé selon l'une des revendications 3 à 12, caractérisé par le fait que le catalyseur utilisé pour la réaction de condensation est constitué par l'hydrogénosulfate

d'un métal alcalin, de préférence de l'hydrogénosulfate de potassium ou de sodium.

14. Cristaux de fluorescéine de couleur jaune présentant le spectre de radiocristallographie de la figure 2.

5 15. Cristaux de 4',5'-diméthylfluorescéine de couleur jaune présentant le spectre de radiocristallographie de la figure 4.

16. Cristaux de 4',5'-dihydroxyfluorescéine de couleur marron-rouge ou acajou présentant le spectre de  
10 radiocristallographie de la figure 6.

17. Phtaléines obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 13.

18. Fluorescéine obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 13.

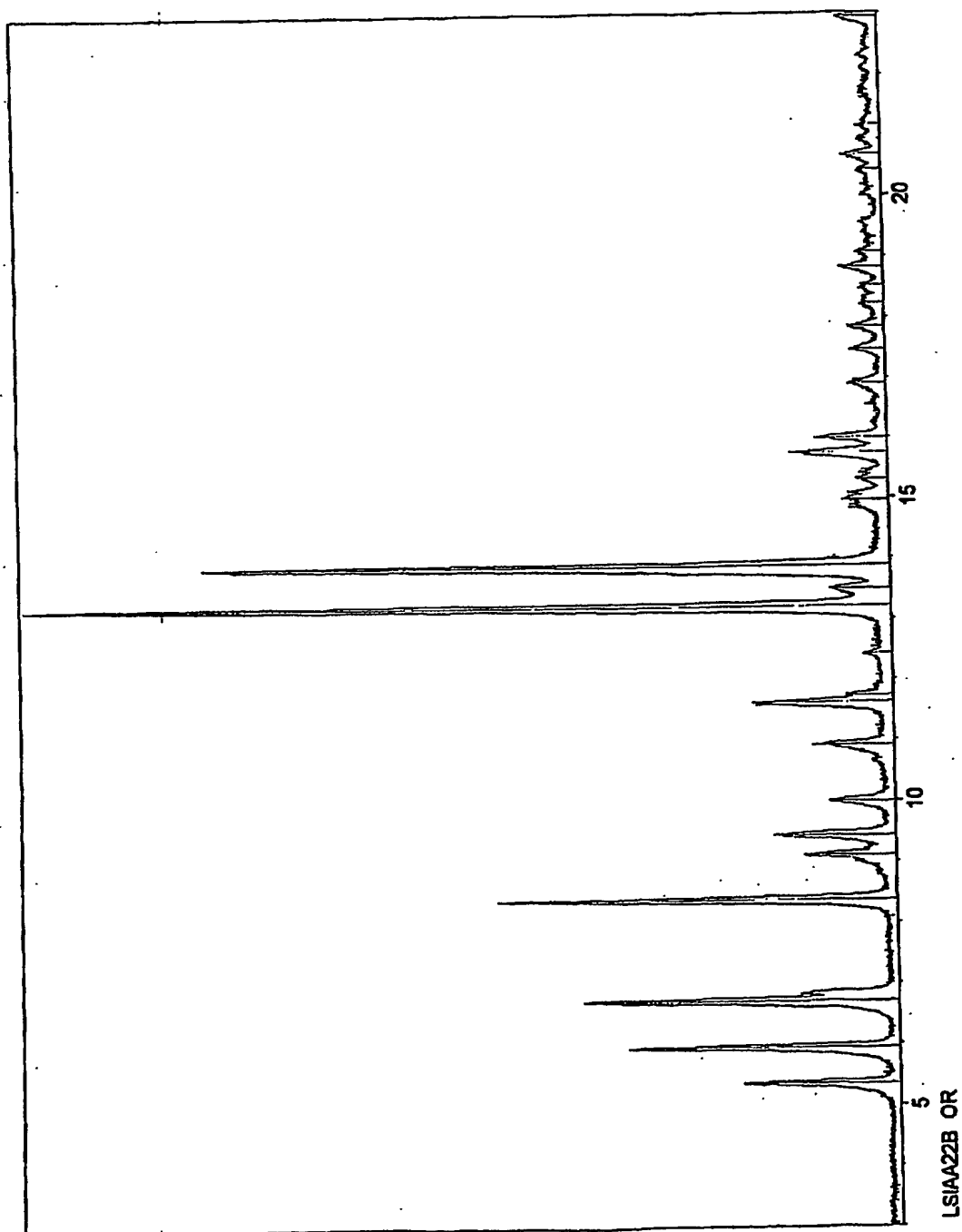
15 19. 4',5'-diméthylfluorescéine obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 13.

20. 4',5'-dihydroxyfluorescéine obtenue par un procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 13.

21. Utilisation de la fluorescéine selon la  
20 revendication 2 ou obtenue selon le procédé des revendications 3 à 13 dans des applications pharmaceutiques en diagnostic notamment en imagerie médicale ou dans le domaine des applications en biotechnologie.



**FIGURE 1**  
Radiocristallographie  
de la fluorescéine brute



**FIGURE 2**  
Radiocristallographie de la fluorescéine  
après conversion par l'acide (jaune)

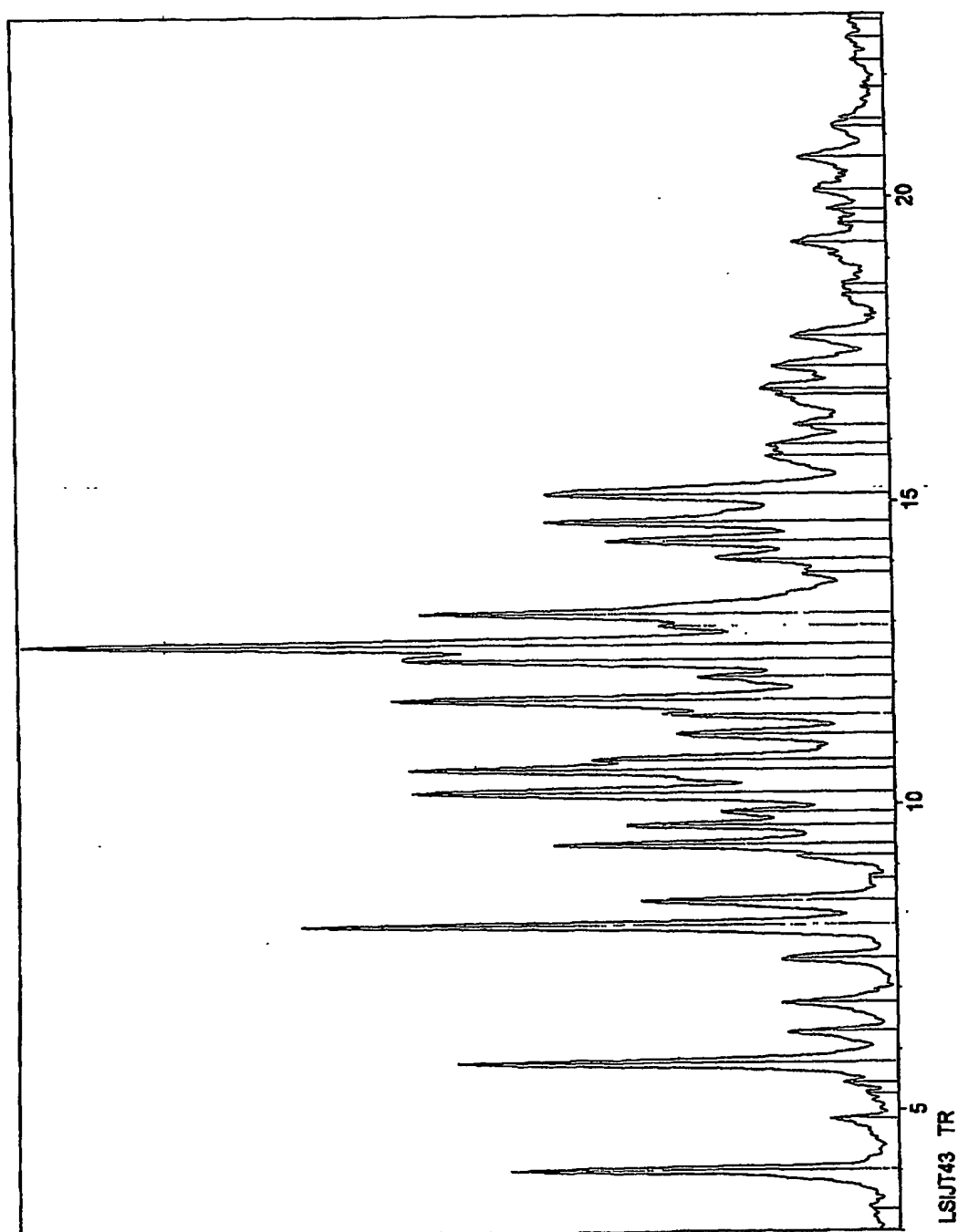


FIGURE 3  
Radiocristallographie  
de la 4',5'-diméthylfluorescéine brute

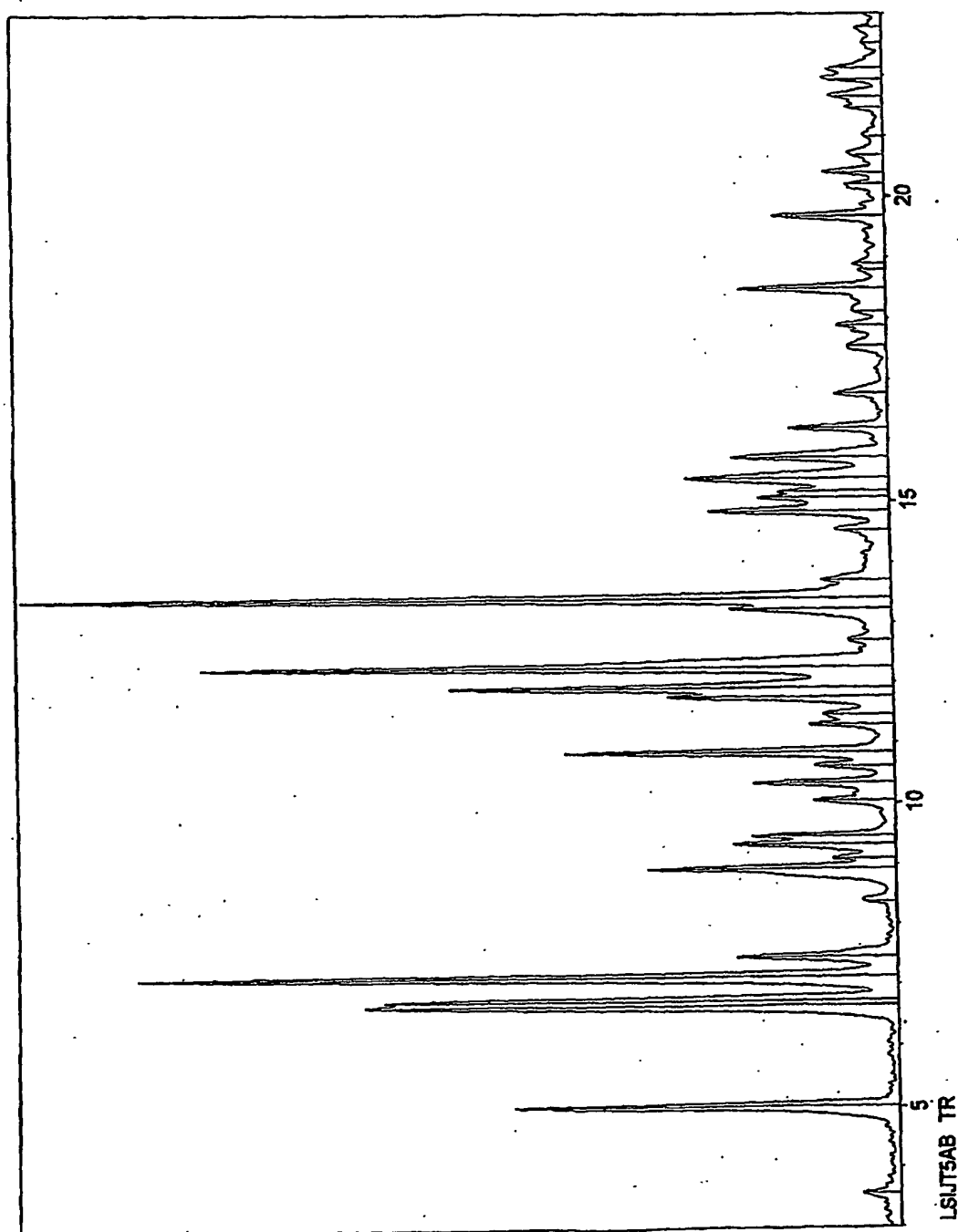
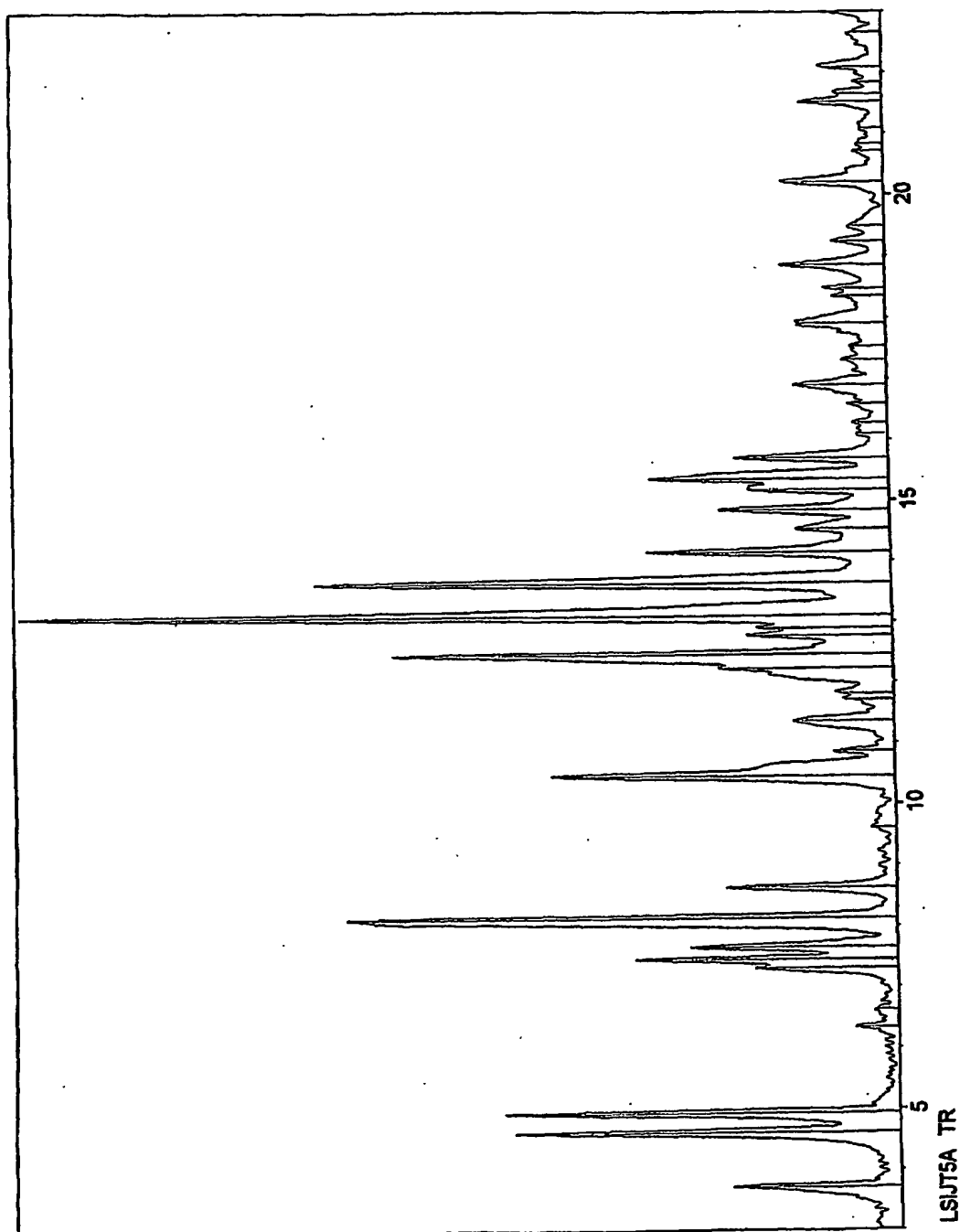


FIGURE 4

Radiocristallographie de la 4',5'-diméthylfluorescéine  
après conversion par l'acide



**FIGURE 5**  
Radiocristallographie  
de la 4',5'-dihydroxyfluorescéine brute

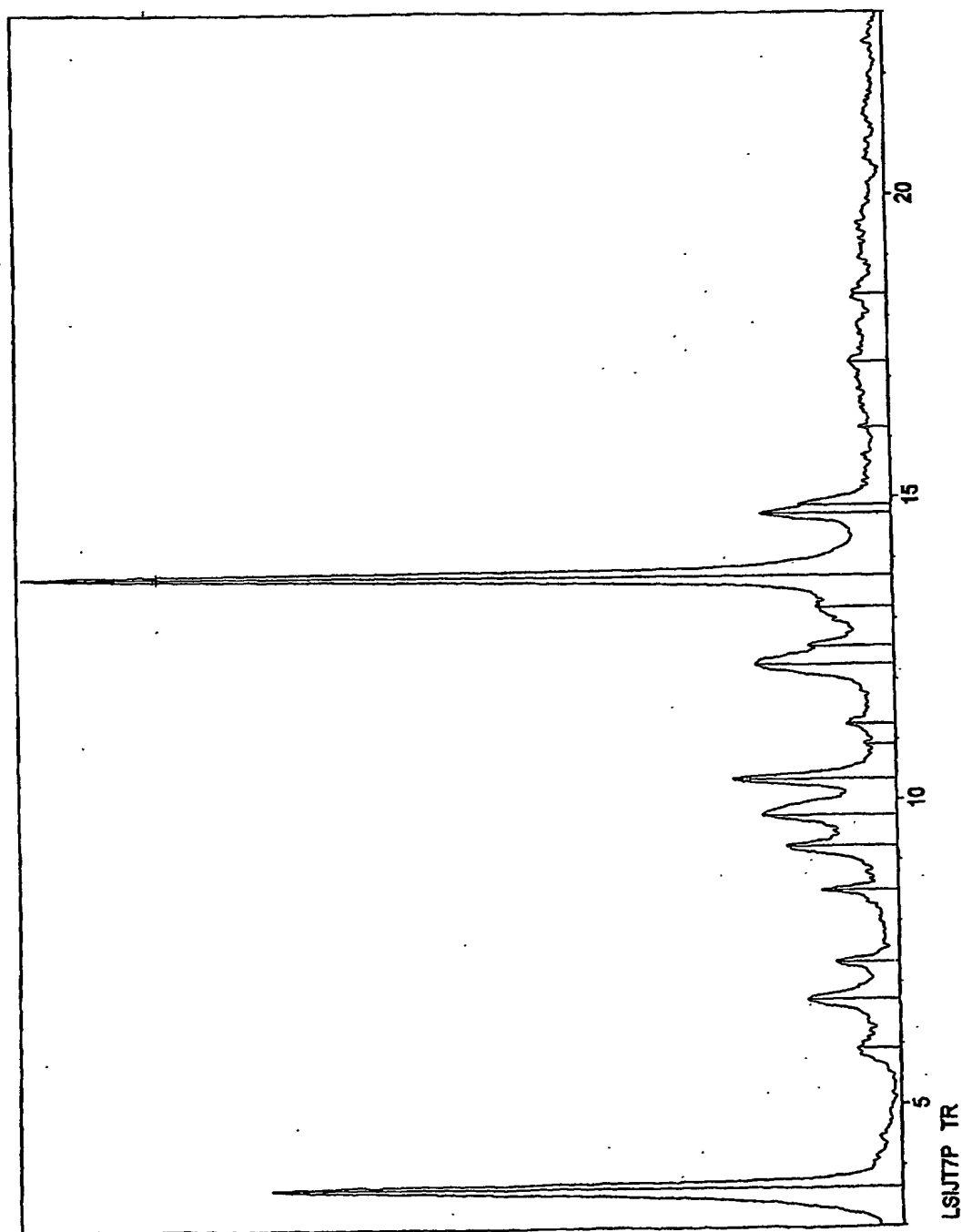
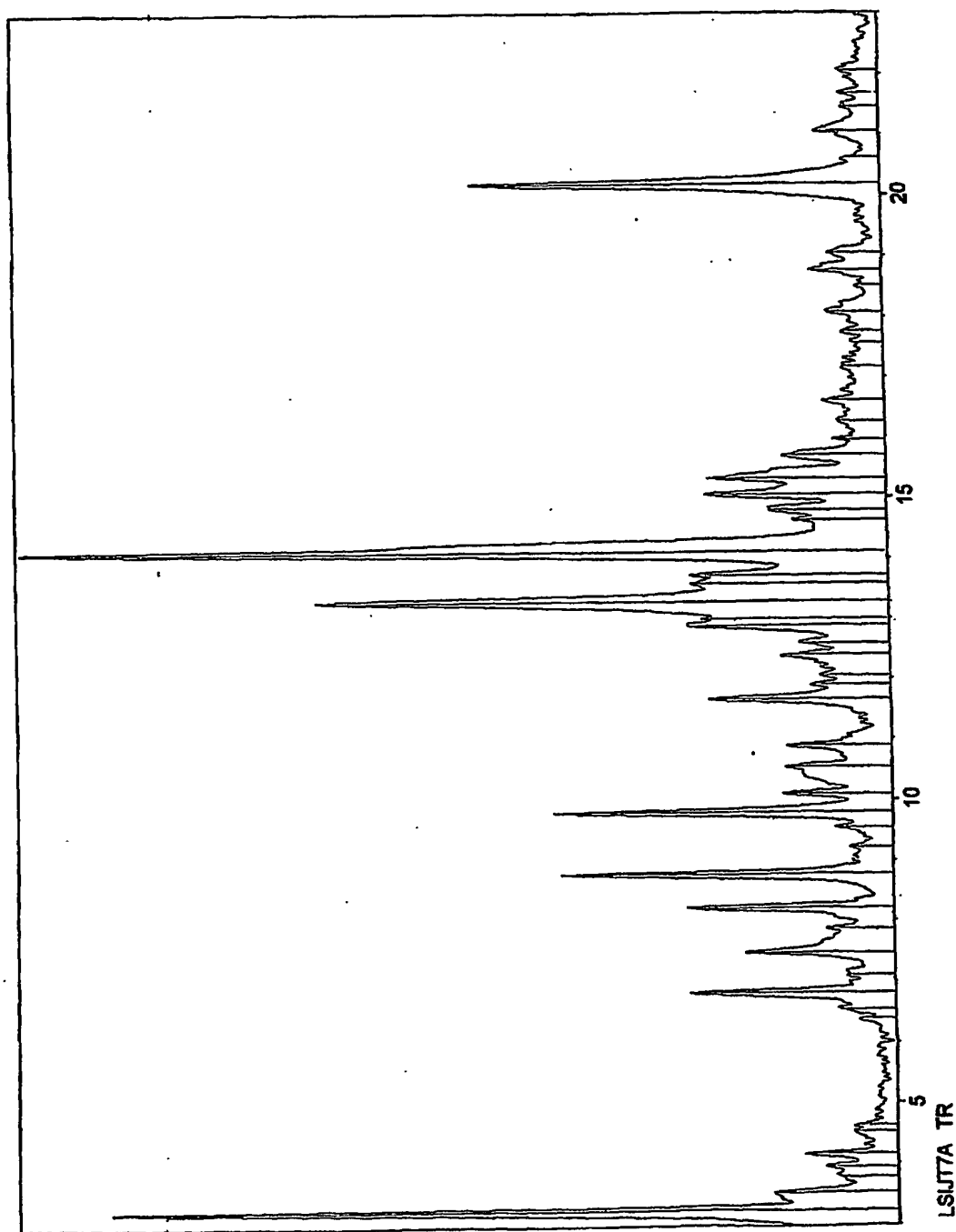


FIGURE 6

Radiocristallographie de la 4',5'-dihydroxyfluorescéine  
après conversion par l'acide



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 03/03205

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07D493/10 A61K49/00 G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5 637 733 A (SUJEETH PUTHALATH K) 10 June 1997 (1997-06-10) the whole document	1,2 14,17, 18,21
X A	DE 360 691 C (MONSANTO CHEMICAL WORKS) 6 October 1922 (1922-10-06) cited in the application the whole document	1,2,16, 20 14,17, 18,21
X	R.C. GIBBS: "The absorption spectra of some phthaleins of the trihydroxyphenols" J. AM. CHEM. SOC, vol. 51, 1929, page 1755-66, XP002248840 page 1757, line 1	1,16,20
	----- -/-- -----	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 2004

Date of mailing of the international search report

25/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Diederer, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR J3/03205

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHAWN C. BURDETTE ET AL.: "fluorescent sensors for Zn <sup>2+</sup> Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution" J. AM. CHEM. SOC, vol. 123, 2001, page 7831-41, XP002248841 4',5'-dimethylfluorescéine -----	1, 15, 19
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002248842 accession no. STN Database accession no. 91:124850 abstract -& MATVEETS, M.A. ET AL.: "Study of spectrophotometric and luminescence properties of hydroxyxanthene dyes in aqueous solution" ZHURNAL ANALITICHESKOI KHIMII, vol. 34, no. 6, 1979, pages 1049-54, XP008020063 document contient fluorescéine.H2SO4 -----	1, 2, 14, 17, 18, 21
A	US 1 931 049 A (KRANZ FREDERICK H ET AL) 17 October 1933 (1933-10-17) cited in the application the whole document -----	1, 2, 14, 17, 18, 21
A	US 1 965 842 A (KRANZ FREDERICK H) 10 July 1934 (1934-07-10) cited in the application the whole document -----	1, 2, 14, 17, 18, 21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/FR 03/03205

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5637733	A	10-06-1997	NONE	
DE 360691	C	06-10-1922	NONE	
US 1931049	A	17-10-1933	NONE	
US 1965842	A	10-07-1934	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/03205

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C07D493/10 A61K49/00 G01N21/64		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07D A61K A61P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X A	US 5 637 733 A (SUJEETH PUTHALATH K) 10 juin 1997 (1997-06-10) le document en entier	1,2  14,17, 18,21
X A	DE 360 691 C (MONSANTO CHEMICAL WORKS) 6 octobre 1922 (1922-10-06) cité dans la demande le document en entier	1,2,16, 20  14,17, 18,21
X	R.C. GIBBS: "The absorption spectra of some phthaleins of the trihydroxyphenols" J. AM. CHEM. SOC, vol. 51, 1929, page 1755-66, XP002248840 page 1757, ligne 1	1,16,20
----- -/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>° Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">18 mars 2004</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25/03/2004</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Diederer, J</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No

PCT/FR 03/03205

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	SHAWN C. BURDETTE ET AL.: "fluorescent sensors for Zn <sup>2+</sup> Based on a Fluorescein Platform: Synthesis, Properties and Intracellular Distribution" J. AM. CHEM. SOC, vol. 123, 2001, page 7831-41, XP002248841 4',5'-dimethylfluorescéine	1,15,19
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002248842 accession no. STN Database accession no. 91:124850 abrégé -& MATVEETS, M.A. ET AL.: "Study of spectrophotometric and luminescence properties of hydroxyxanthene dyes in aqueous solution" ZHURNAL ANALITICHESKOI KHIMII, vol. 34, no. 6, 1979, pages 1049-54, XP008020063 document contient fluorescéine.H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2,14, 17,18,21
A	US 1 931 049 A (KRANZ FREDERICK H ET AL) 17 octobre 1933 (1933-10-17) cité dans la demande le document en entier	1,2,14, 17,18,21
A	US 1 965 842 A (KRANZ FREDERICK H) 10 juillet 1934 (1934-07-10) cité dans la demande le document en entier	1,2,14, 17,18,21

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/03205

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5637733	A	10-06-1997	AUCUN	
DE 360691	C	06-10-1922	AUCUN	
US 1931049	A	17-10-1933	AUCUN	
US 1965842	A	10-07-1934	AUCUN	